

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра Оптики и биофотоники

**Определение показателя преломления и толщины однослойного
микрообъекта биологического происхождения с помощью лазерного
интерферометра с остророфокусированными пучками**

название темы выпускной квалификационной работы полужирным шрифтом

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента(ки) 4 курса 4082 группы
направления (специальности) 12.03.04 Биотехнические системы и
технологии

код и наименование направления (специальности)

Института физики

наименование факультета, института, колледжа

Греся Артёма Александровича

фамилия, имя, отчество

Научный руководитель

с.н.с., д.ф.-м.н., профессор

должность, уч. степень, уч. звание



дата, подпись

В.Л. Дербов

инициалы, фамилия

Научный консультант

с.н.с. ИПТМУ РАН, к.ф.-м.н.

должность, уч. степень, уч. звание



дата, подпись

Д.В. Лякин

инициалы, фамилия

Заведующий кафедрой

проф. д.ф.-м.н., чл.-корр. РАН

должность, уч. степень, уч. звание



дата, подпись

В.В. Тучин

инициалы, фамилия

Саратов 2025 год

Введение. Современные методы исследования биологических микрообъектов, такие как клетки, ткани и их структурные компоненты, требуют высокой точности и неразрушающего характера анализа. Важнейшими параметрами, характеризующими оптические свойства таких объектов, являются показатель преломления и толщина, которые тесно связаны с их функциональными и морфологическими характеристиками.

Актуальность данной работы обусловлена необходимостью развития неразрушающих методов исследования биологических микрообъектов, которые могут быть использованы в биологии, медицине и биотехнологии. Например, точное определение показателя преломления клеток крови может быть применено для диагностики заболеваний, таких как анемия или лейкоз [1]. Кроме того, знание толщины и показателя преломления различных слоев тканей важно для разработки новых методов визуализации и терапии.

Целью данной работы является разработка методики и экспериментальное определение показателя преломления и толщины однослойного микрообъекта биологического происхождения с использованием лазерного интерферометра с остросфокусированными пучками. Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

- Изучение теоретических основ интерферометрии и методов расчета показателя преломления и толщины.
- Разработка экспериментальной установки на базе конфокального интерференционного микроскопа.
- Проведение экспериментов с использованием покровных стекол и биологического объекта.
- Анализ полученных данных и сравнение результатов.

В работе использовались как небиологические, так и биологические материалы. В качестве небиологического материала использовались 4 образца боросиликатных покровных стекол марки «Schott D263M/ D263T» различной толщины. В качестве биологического объекта в работе использовался яичный белок, помещённый в специальную плоскую кювету.

Данная работа включает в себя 6 разделов: введение, обзор литературы, методы и материалы, результаты и обсуждения, заключение и список использованных источников.

Основное содержание работы. В работе использовалась установка - интерференционный микроскоп, с помощью которой осуществлялся эксперимент со слоистыми объектами. Особенности установки заключаются в необходимом доступе к исследуемому объекту только с одной стороны, а также проведение измерений путём сканирования слоистого объекта сфокусированным пучком по его глубине за счет непрерывного циклического смещения объекта относительно перетяжки зондирующего пучка, приводящего к последовательной фокусировке этого пучка на границы объекта. (рис. 1).

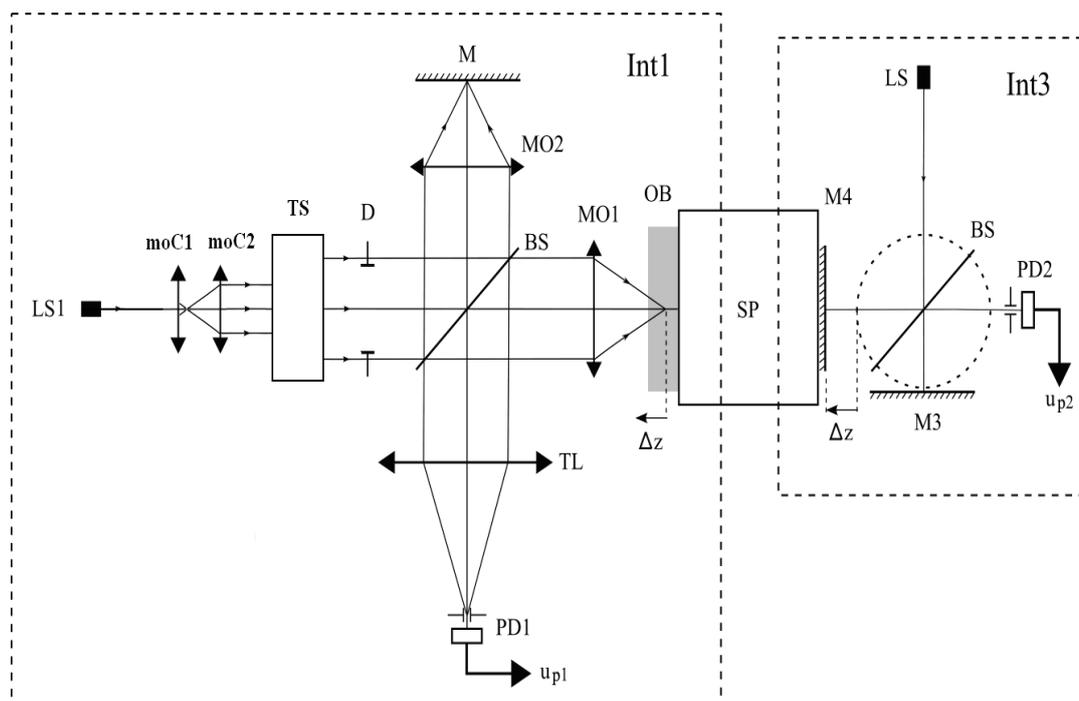


Рисунок 8 - Оптическая схема экспериментальной установки: Int1 – измерительный интерферометр-микроскоп с остросфокусированными пучками; Int3 – интерферометр следящей системы с лазерным источником света. М, М3, М4 – плоские зеркала; BS – светоделительная призма; MO1, MO2, moC1, moC2 – микрообъективы; D – апертурная диафрагма; TL – тубусная линза; OB – слоистый объект; SP – сканирующая платформа электромеханического сканера; LS1, LS – лазерные источники света; PD1, PD2 – фотодетекторы; u_{p1} , u_{p2} - фотоэлектрические сигналы; Δz - продольное смещение слоистого объекта относительно фокальной точки микрообъектива MO1

Первой серией исследования являлось определение экспериментальной зависимости изменения расстояния между оптическими максимумами сигналов передней и задней границы от значения числовой апертуры. Другими словами, определялась геометрическая толщина образца d в предположении, что показатель преломления исследуемого объекта n известен. Первым этапом заключалось нахождение величины смещения δz . Для этого в программном обеспечении ADCLab (рис. 12) регистрировались сигналы u_{p1} и u_{p2} . (рис. 1.),

данные сохранялись в формате ASCII-текста (.txt). В процессе эксперимента числовая апертура зондирующего пучка NA изменялась путём изменения диаметра апертурной диафрагмы D на входе интерферометра Int1 (рис. 1), в диапазоне от 7.5 до 2 мм с шагом 0.5 мм. Для каждого значения диаметра апертурной диафрагмы записывалось по 10 файлов, которые затем последовательно обрабатывались в среде «PTC MathCAD 15». По результатам десяти измерений находилось среднее арифметическое значение и среднее квадратическое отклонение. Величина смещения δz определялась как расстояние между двумя максимумами (импульсами) сигналов. Первый максимум соответствовал отражению от передней границы объекта, второй — отражению от задней границы (рис. 2).

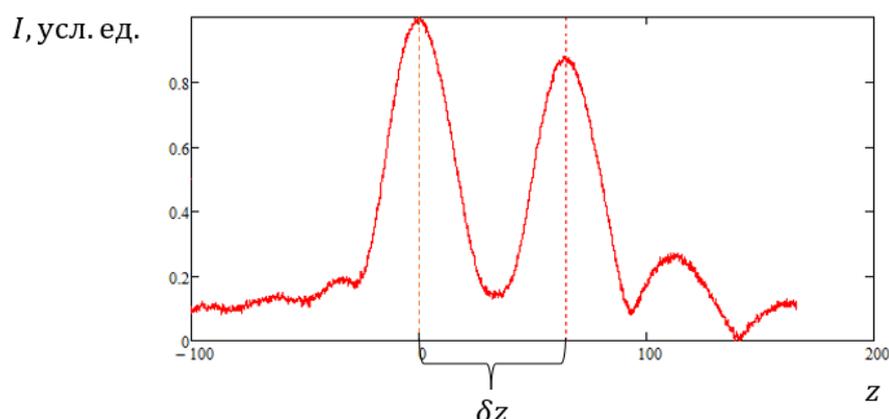


Рисунок 2 - Нормированная огибающая интерференционного сигнала как функция смещения Δz объекта относительно перетяжки зондирующего пучка при $D = 2$ мм

Для определения геометрической толщины d и показателя преломления n было предложено рассмотрено несколько способов. Первый способ – вывод математический подсчет по формулам (1) и (2):

$$d = \delta z_1 \delta z_2 \sqrt{\frac{(n_0 + \sqrt{n_0^2 - NA_1^2})^2 - (n_0 + \sqrt{n_0^2 - NA_2^2})^2}{(n_0 + \sqrt{n_0^2 - NA_1^2})^2 \delta z_2^2 - (n_0 + \sqrt{n_0^2 - NA_2^2})^2 \delta z_1^2}} \quad (1)$$

$$n = \frac{1}{2} \sqrt{4n_0^2 + \frac{\left(n_0 + \sqrt{n_0^2 - NA_1^2}\right)^2 \left(n_0 + \sqrt{n_0^2 - NA_2^2}\right)^2 (\delta z_1^2 - \delta z_2^2)}{(n_0 + \sqrt{n_0^2 - NA_1^2})^2 \delta z_2^2 - (n_0 + \sqrt{n_0^2 - NA_2^2})^2 \delta z_1^2}} \quad (2)$$

где δz_1 , δz_2 – величины смещения, полученные при соответствующих числовых апертурах NA_1 и NA_2 , n_0 – показатель преломления внешней среды;

Однако данный способ расчета показал себя крайне чувствительным к значениям параметров δz_1 и δz_2 , определяемых экспериментально, что может приводить к значительным ошибкам в результатах определения показателя преломления n и геометрической толщины d . Таким образом, этот метод не соответствует требованиям точности, предъявляемым для достижения цели настоящей работы.

Второй способ – подгонка теоретической кривой к полученным экспериментальным значениям. На график (рис. 3) наносились экспериментальные значения δz , полученные при определённом значении диаметра апертурной диафрагмы, для $n_0 = 1$; $n = 1.5212$, где n – показатель преломления покровного стекла, вычисленный по данным завода-изготовителя. Функция кривой была определена выражением (3).

$$\delta z(NA) = d \frac{n_0 + \sqrt{n_0^2 - NA^2}}{\sqrt{4(n^2 - n_0^2) + (n_0 + \sqrt{n_0^2 - NA^2})^2}} \quad (3)$$

где δz – функция величины смещения от значения числовой апертуры NA d – геометрическая толщина; n_0 – показатель преломления внешней среды; n – показатель преломления исследуемой среды.

В функции (3) геометрическая толщина d рассматривалась как параметр. Подбиралось такое значение параметра d , при котором теоретическая кривая

наилучшим образом аппроксимировала экспериментальные точки. Пример подгонки одного из образцов покровного стекла представлен на рис. 3.

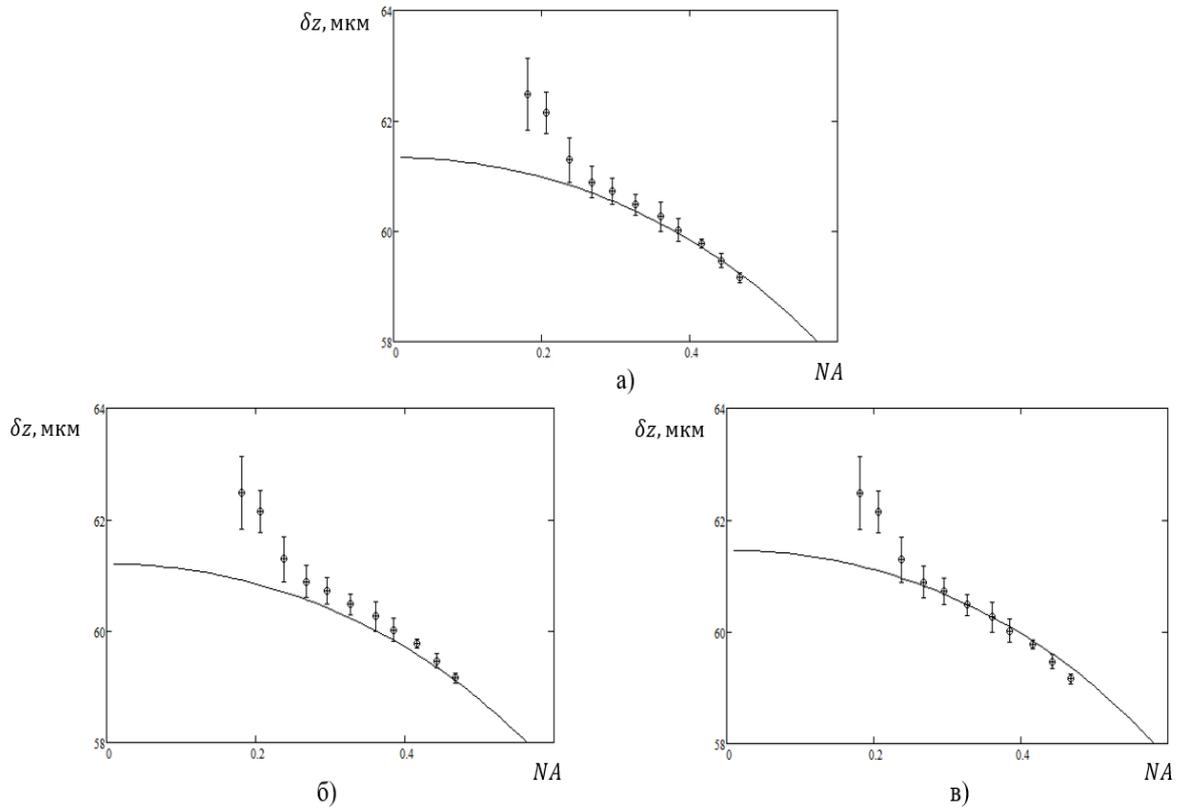


Рисунок 3 - Зависимость величины смещения δz от числовой апертуры NA сплошная линия – теоретическая зависимость; точки – реальные значения: а) при $d = 93.3$; б) при $d = 93.1$; в) при $d = 93.5$

При подгонке теоретической кривой точки с малой числовой апертурой NA не учитывались, поскольку при малых значениях числовой апертуры возникает значительная сферическая аберрация [2]. Таким образом, через максимальное количество точек теоретическая кривая проходит при параметре $d = 93.3$ μm . Следовательно, можно предположить, что геометрическая толщина покровного стекла в данном случае составляет 93.3 ± 0.1 μm . Однако данный метод применим только для исследования образцов покровных стёкол с заранее известным показателем преломления. Аналогичным способом можно поступить для определения показателя

преломления объекта – при известном значении его геометрической толщины. Таким методом в работе был определен показатель преломления белка куриного яйца.

Исходя из вышеизложенного, для определения показателя преломления яичного белка был предложен следующий порядок действий:

1. Сканирование пустой кюветы: проводилось сканирование пустой кюветы для вычисления величины δz для воздушного зазора кюветы;
2. Построение экспоненциальная зависимость для вычисления
Определение геометрической толщины d зазора кюветы: на основе полученных экспериментальных данных строилась теоретическая зависимость (3) для вычисления путем подгонки геометрической толщины d при параметрах $n_0 = 1$; $n = 1$;
3. Добавление яичного белка в зазор кюветы и повторное сканирование: В кювету добавлялся яичный белок, после чего проводилось сканирование для определения новой величины δz ;
4. Определение показателя преломления n белка: По построенной теоретической кривой, при найденном значении геометрической толщины d , определялся показатель преломления n .

Результаты измерения геометрической толщины покровных стекол, полученные путем метода подсчета по формулам (1) и (2) в сравнении со значениями, полученными путем измерения щуповым прибором представлены в табл. 1. В формулах (1) и (2), значения δz_1 и δz_2 представляли собой усреднённые величины смещения $\overline{\delta z_1}$ и $\overline{\delta z_2}$, полученные при сканировании объекта с диаметрами апертурной диафрагмы D_1 и D_2 соответственно. При $D_1 = 7$, $NA_1 \sim 0.47$; при $D_2 = 5$, $NA_2 \sim 0.31$:

Таблица 1 – Результаты подсчетов геометрической толщины и показателя преломления оптического стекла марки Schott D263M/ D263T по

выведенным формулам, где $\overline{\delta z_1}$ и $\overline{\delta z_2}$ – усредненные величины смещения d_0 – толщина, померенная щуповым прибором, d_1 – значения, полученные по формуле (1), n – показатель преломления, полученный с данных от производителя; n_1 – показатель преломления, высчитанный по формуле (2)

№ Образца	$\overline{\delta z_1}$, мкм, при $D_1 = 7$	$\overline{\delta z_2}$, мкм, при $D_2 = 5$	d_0 , мкм	d_1 , мкм	n	n_1
1	59.210	60.461	94 ± 1	95.6	1.5212	1.541
2	91.957	93.900	144 ± 1	144.9		1.519
3	111.186	113.535	174 ± 1	174.2		1.517
4	134.413	137.253	212 ± 1	210.3		1.517

В табл. 2 представлены результаты определения геометрической толщины методом подстановки значений в теоретическую кривую.

Таблица 2 – Значения геометрической толщины оптического стекла марки Schott D263M/ D263T методом подгонки теоретической кривой, где d_0 - толщина, померенная щуповым прибором, d_2 – значение параметра, при котором кривая проходила приблизительно к экспериментальным значениям

№ образца	d_0 , мкм	d_2 , мкм
1	94 ± 1	93.3 ± 0.1
2	144 ± 1	144.9 ± 0.1
3	174 ± 1	175.1 ± 0.1
4	212 ± 1	211.8 ± 0.1

После сканирования пустой кюветы аналогичным образом выполнялась подгонка прямой для определения геометрической толщины d_3 на основе экспериментальных значений (рис. 4)

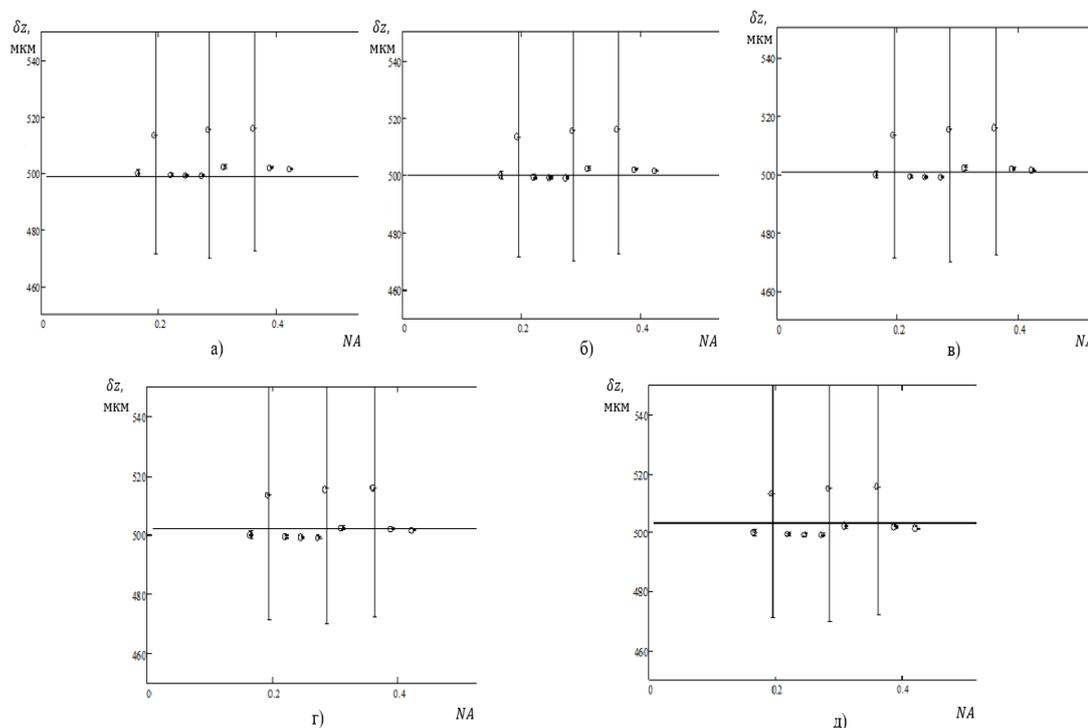


Рисунок 4 –Зависимость величины смещения δz от числовой апертуры NA сплошная линия – теоретическая зависимость; точки – реальные значения: а) при $d_3 = 499$; б) при $d_3 = 500$; в) при $d_3 = 501$; г) при $d_3 = 502$; д) при $d_3 = 503$

На графиках рис. 4, три точки, значительно отклоняющиеся от приближённого значения, были исключены из анализа как ошибки, вызванные внешними факторами во время измерений. В качестве наиболее подходящих прямых были выбраны графики на рис. 4 (б, в). Таким образом, геометрическая толщина кюветы была определена как $d_3 = 500.5 \pm 0.5$.

После сканирования кюветы с яичным белком по найденному значению геометрической толщины d_3 выполнялась подгонка значения показателя преломления n (рис. 5).

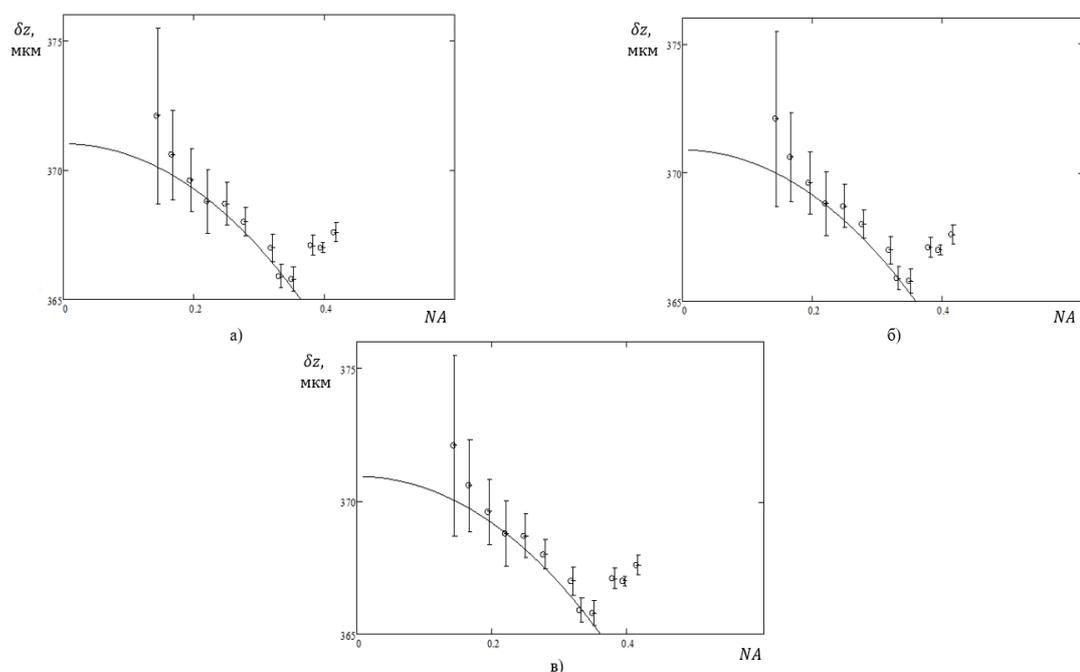


Рисунок 5 – Зависимость величины смещения δz от числовой апертуры NA сплошная линия – теоретическая зависимость; точки – реальные значения: а) при $n = 1.3490$; б) при $n = 1.3495$; в) при $n = 1.3493$

На графиках рис. 5, три крайние правые точки при подгонке кривой не учитывались, так как они были признаны ошибочными вследствие искажений, аналогичных тем, которые наблюдались на графиках рис. 4. Аналогичным образом, теоретическая кривая на графике на рис. 5(б) была выбрана как наиболее подходящая и показатель преломления яичного белка был определён как $n = 1.3493$.

Заключение. Метод подстановки известных данных в формулы (1) и (2) продемонстрировал свою неэффективность для определения оптических параметров с высокой точностью. В то же время метод подгонки теоретической зависимости позволил определить геометрическую толщину и показатель преломления как для образцов покровных стёкол, так и для яичного белка. По данным табл. 2 только геометрическая толщина d_2 образца №3 не попадает в диапазон ожидаемых значений d_0 . Причиной этого может служить

незначительная погрешность при определении величины смещения δz , вызванная внешними факторами.

В работе J.C. Baird и J.H. Prentice [3], авторы с помощью рефрактометра Аббе провели измерение показателя преломления яичного белка при центральной длине волны натриевой лампы $\lambda_{\text{НЛ}} = 589$ нм:

$$n_{\text{яБ}(589)} = 1.36$$

Сравнивая полученный в ходе эксперимента результат с данными работы [3], можно предполагать, что показатель преломления определён корректно. Кроме того, метод расчёта путём подгонки кривой к экспериментальным значениям подтверждает свою эффективность.

Список использованных источников:

1. Park Y., Deppeursinge C., Popescu G. Quantitative phase imaging in biomedicine // Nature Photonics. – 2018. – Vol. 12. – P. 578–589.
2. Лякин Д. В., Максимова Л. А., Рябухо В. П. Безабберрационная ширина углового спектра зондирующего слоистый объект поля в конфокальной микроскопии // Оптика и спектроскопия. – 2019. – Т. 127. – № 3. – С. 514–522.
3. Baird J.C., Prentice J.H. The changes with age of the hydrogen ion concentration of egg white and egg yolk and of the refractive index of the egg white // Analyst. –1930. – №36. – P. 20-23.

